

# PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 2002-325571

(43)Date of publication of application : 12.11.2002

(51)Int.Cl.

C12N 15/09  
A61K 35/44  
A61K 35/48  
A61K 48/00  
A61P 21/02  
A61P 27/06  
C12N 5/10

(21)Application number : 2001-133721

(71)Applicant : PUROTEKKU,KK

(22)Date of filing : 27.04.2001

(72)Inventor : TAKAHASHI MASAYO  
HARUTA MASATOSHI

(54) METHOD FOR INDUCING DIFFERENTIATION OF RETINA

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To provide a method for inducing differentiation of a retinal nerve cell, capable of making a cell derived from a nerve stem cell express its function by making the retina take the nerve stem cell and making the taken nerve stem cell differentiate, so that a marker of optic cell or a marker of bipolar cell can be expressed concretely, and to provide the retinal nerve cell capable of expressing the marker of optic cell or the marker of bipolar cell, so that the retinal nerve cell is suitably used to be transplanted to the retina or the like.

SOLUTION: This method for inducing the differentiation of the retinal nerve cell comprises obtaining the nerve stem cell or a nerve stem precursor cell from a cell derived from the eyeball tissue or an embryonic stem cell, introducing a homeobox gene specific to the retina into the nerve stem cell or the nerve stem precursor cell, and culturing the obtained cell under a differentiation-inducing condition. The retinal nerve cell is obtained by the method for inducing the differentiation of the retinal nerve cell.

## LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]  
[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

BEST AVAILABLE COPY

## \* NOTICES \*

JP0 and MCIP1 are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

1. This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.

2.\*\*\* shows the word which can not be translated.

3.In the drawings, any words are not translated.

## CLAIMS

[Claim(s)]

[Claim 1] The differentiation-inducing approach of the retina nerve cell characterized by cultivating the cell which obtained the neural stem cell or the nerve precursor cell, introduced the retina specific homeobox gene into this neural stem cell or the nerve precursor cell, and was obtained from the eyeball organization origin cell or the embryonic stem cell under a differentiation-inducing condition.

[Claim 2] The differentiation-inducing approach according to claim 1 which is one sort chosen from the group which an eyeball organization origin cell becomes from the embryo nerve net film, a ciliary body coloring matter epithelial cell, and a retinal-pigment-epithelium cell.

[Claim 3] The differentiation-inducing approach according to claim 1 or 2 which is at least one sort chosen from the group which a retina specific homeobox gene becomes from Crx, Chx10, Pax6, and Rax.

[Claim 4] The differentiation-inducing approach given in claim 1 - 3 any 1 terms whose differentiation-inducing conditions are culture under existence with a retinoic acid and a blood serum.

[Claim 5] Differentiation-inducing conditions are N2 under existence with a retinoic acid and a blood serum. The differentiation-inducing approach according to claim 4 which are the conditions cultivated by DMEM/F12 containing a supplement.

[Claim 6] The retina nerve cell obtained by the differentiation-inducing approach of a retina nerve cell given in claim 1 - 5 any 1 terms.

[Claim 7] The retina nerve cell according to claim 6 which presents an opsin positivity or a PKC positivity.

[Translation done.]

## \* NOTICES \*

JP0 and NCIP1 are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

1. This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
- 2.\*\*\* shows the word which can not be translated.
- 3.in the drawings, any words are not translated.

## DETAILED DESCRIPTION

[Detailed Description of the Invention]

[0001] [Field of the Invention] This invention relates to the retina nerve cell obtained by the differentiation-inducing approach of a retina nerve cell and this differentiation-inducing approach of offering transplantation to a retina, and the cell which was suitable for autotransplantation especially.

[0002] [Description of the Prior Art] In recent years, existence of the neural stem cell in a brain and a spine comes to be accepted, and it has a hope for a transplantation therapy, nervous playback medicine, etc. to the Parkinson's disease and degenerative pigmentosa retinae using this stem cell.

[0003] It is reported by the transplantation experiment using the neural stem cell of a rat or a mouse about the neural stem cell that the neural stem cell transplanted in the brain moves to a suitable location, and specializes in neurone or a glaea.

[0004] the playback medicine in an ophthalmology field — setting — an adult — this neural stem cell carrying out migration to a retina, carrying out take to it, specializing in various retinal cell Mr. cells, and also reproducing a nerve fiber, when a rat hippocampus origin neural stem cell is poured in into the vitreous chamber of the rat on two — after-the-birth the 7th to which nervous differentiation is advancing is known.

[0005] However, the present condition is having not resulted in the manifestation of the function of the retina nerve cell of not specializing but recognizing light until it functions as a retina nerve cell.

[0006] Therefore, the means with possible discovering a neural stem cell to a retina and making take and the cell which was made to specialize and was guided from this neural stem cell discover the function as a retina nerve cell is demanded.

[0007] [Problem(s) to be Solved by the Invention] It aims at offering the differentiation-inducing approach of a retina nerve cell with that this invention discovers a neural stem cell to a retina, and makes take and the cell which was made to specialize and was guided from this neural stem cell discover a function, and specifically possible making the marker or bipolar cell marker of a visual cell discover. Moreover, this invention aims at offering the retina nerve cell which presents the suitable marker or suitable bipolar cell marker of a visual cell for the transplantation to a retina etc.

[0008] [Means for Solving the Problem] Namely, this invention [1] From an eyeball organization origin cell or an embryonic stem cell A neural stem cell or a nerve precursor cell is obtained. To this neural stem cell or a nerve precursor cell It is characterized by introducing a retina specific homeobox gene and cultivating the obtained cell under a differentiation-inducing condition. The differentiation-inducing approach of a retina nerve cell [2] An eyeball organization origin cell Embryo nerve net film, It is one sort chosen from the group which consists of a ciliary body coloring matter epithelial cell and a retinal-pigment-epithelium cell. The differentiation-inducing

approach of the aforementioned [1] publication [3] A retina specific homeobox gene It is at least one sort chosen from the group which consists of Crx, Chx10, Pax and Rex. The above [1] or the differentiation-inducing approach given in [2] [4] Differentiation-inducing conditions The differentiation-inducing approach given in the aforementioned [— [1]] [3] any 1 term which is culture under existence with a retinoic acid and a blood serum. [5] Differentiation-inducing conditions are N2 under existence with a retinoic acid and a blood serum. It is cultivating by DMEM/F12 containing a supplement. The differentiation-inducing approach of the aforementioned [4] publication [6] In the retina nerve cell and list [7] which are obtained by the differentiation-inducing approach of a retina nerve cell given in the aforementioned [— [1]] [5] any 1 term It is related with the retina nerve cell of the aforementioned [6] publication which presents an opsin positivity or a PKC positivity.

[0009]

[Embodiment of the Invention] The differentiation-inducing approach of the retina nerve cell of this invention has one big description in cultivating the cell which obtained the neural stem cell or the nerve precursor cell, introduced the retina specific homeobox gene into this neural stem cell or the nerve precursor cell, and was obtained from the eyeball organization origin cell under a differentiation-inducing condition.

[0010] According to the differentiation-inducing approach of the retina nerve cell of this invention, by the case where a hippocampus origin neural stem cell is made to transplant and specialize in a retina, making it discovered demonstrates the outstanding effectiveness of the ability to make the function of the difficult visual cell or a bipolar cell discover.

[0011] Furthermore, since the cell which discovers the function of a visual cell or a bipolar cell and which presents an opsin positivity or a PKC positivity can specifically be obtained according to the differentiation-inducing approach of the retina nerve cell of this invention, the outstanding effectiveness that a useful cell can be developed to the playback medicine of a retina is demonstrated.

[0012] Specifically in the differentiation-inducing approach of this invention, a \*\*\* inner layer etc. is mentioned to an eyeball organization and a twist concrete target that the organizations which are used for obtaining a neural stem cell or a nerve precursor cell, and get should just be the marker of a visual cell, for example, opsin, the marker of a bipolar cell, and an organization that may discover PKC by introducing a retina specific homeobox gene into the obtained cell, moreover, this organization — an adult — it may be the origin or you may be the individual origin of fetus.

[0013] Moreover, in the differentiation-inducing approach of this invention, a neural stem cell or a nerve precursor cell may be obtained from this embryonic stem cell using an embryonic stem cell.

[0014] as the approach of guiding to a neural stem cell or a nerve precursor cell from said embryonic stem cell — reference of Kawasaki, Sasaki and others [Kawasaki, H., Sasaki Y., Neuron, and 2000 Oct; 26(1):31-40] etc. — the technique of a publication etc. is mentioned. In addition, refer to a "molecular biology protocol", the Nankodo issue, etc. for conditions, such as culture of an embryonic stem cell, and maintenance.

[0015] As said organization origin cell, the embryo nerve net film, a ciliary body coloring matter epithelial cell, a retinal-pigment-epithelium cell, etc. are mentioned.

[0016] The organization which extracted with the suitable means, for example is processed by Dispace, EDTA, etc., subsequently, trypsinization is carried out and it dissociates to a single cell, said organization origin cell is cultivated until it becomes confluent by the still more suitable culture medium, is extracted trypsinization and by carrying out collagenase processing, and deals in the obtained cell. Here, when cultivating on the occasion of extraction of a cell, culture media, such as a culture medium containing the below-mentioned basic fibroblast growth factor, a culture medium containing an epidermal growth factor, and a culture medium containing LIF (leukocyte migration inhibition factor), can be used.

[0017] A neural stem cell or a nerve precursor cell discovers markers, such as NESUCHIN.

[0018] The neural stem cell or nerve precursor cell of this ciliary body coloring matter epithelial cell origin is also contained in the range of this invention.

[0019] In addition, said neural stem cell or a nerve precursor cell is neural sphere containing this. Although it may be obtained by carrying out, it sets to this invention, and it is this neural sphere. The following transgenics and differentiation inducing to a nerve may be presented.

[0020] As a serum free medium [it is hereafter called a bFGF content serum free medium] containing said basic fibroblast growth factor (bFGF), it is N2. DMEM/F12 containing a supplement etc. is mentioned. It is desirable [the content of said basic fibroblast growth factor in this culture medium] preferably that it is 40 ng/more than ml 20 ng/more than ml 10 ng/more than ml.

[0021] N2 As a supplement, it is an insulin, 5microg [ // ml ] and transferrin 100microg/ml, pro JIESU TRON 20mM, putrescine 100microM, sodium selenate 30nM is mentioned.

[0022] Conditions, such as temperature in the culture in a bFGF content serum free medium, an oxygen density, and carbon dioxide levels, can be suitably set up according to a cell.

[0023] As a retina specific homeobox gene — a generating process — setting — the field of an eye — a specific pattern of manifestation — having — and a field — the gene which controls specific morphogenesis, and differentiation — the gene which participates in the manifestation of a characteristic is mentioned. Specifically, Crx, Chx10, Pax6, Rax, etc. are mentioned. In the differentiation-inducing approach of this invention, from a viewpoint which can make a visual cell marker discover by installation to a neural stem cell or a nerve precursor cell, Crx or Chx10 is mentioned and Chx10 is preferably mentioned from a viewpoint which can make a bipolar cell marker discover. In addition, said base sequence of Crx is shown in GenBank accession number U77615.

[0024] For example, the transgenics approach using an adenovirus vector as the introductory approach of said retina specific homeobox gene to a neural stem cell or a nerve precursor cell, electroporation, the transgenics approach using a retrovirus vector, the transgenics approach using an adeno-associated virus, a RPOFE cushion, electroporation, etc. are mentioned. From a viewpoint of introductory effectiveness, the transgenics approach using an adenovirus vector and the transgenics approach using a retrovirus vector are desirable preferably.

[0025] Subsequently, the neural stem cell or nerve precursor cell by which transgenics was carried out is cultivated under the differentiation-inducing condition suitable for the differentiation to a retina nerve cell.

[0026] As said differentiation-inducing conditions, the culture under existence with a retinoic acid and a blood serum etc. is mentioned. Here, as a culture medium in which it is used for culture and deals, it is N2. DMEM/F12 culture medium containing a supplement etc. is mentioned. Moreover, conditions, such as temperature at the time of culture, an oxygen density, and carbon dioxide levels, can be suitably set up according to a cell.

[0027] It is more than 0.1microM, preferably, as for the amount of said retinoic acid used, it is desirable that it is more than 0.5microM, and it is desirable that it is below 10microM and is below 5microM preferably.

[0028] Moreover, as for the amount of said blood serum used, at the time of differentiation inducing, it is desirable that it is about 1%.

[0029] The cell which specialized by culture of the neural stem cell under differentiation-inducing conditions by which transgenics was carried out, or a nerve precursor cell When the introduced gene is a Crx gene, the opsin positivity which is the marker of a visual cell is presented. And beta-III which is the marker of a nerve cell it has the description of presenting a tubulin positivity, a GFAP positivity, etc. Beta-III which the PKC positivity which is the marker of a bipolar cell is presented, and is the marker of a nerve cell when the introduced gene is Chx10 gene It has the description of presenting a tubulin positivity, a GFAP positivity, etc. Therefore, it can be used, being able to use this cell as a retina nerve cell. The retina nerve cell obtained by this differentiation-inducing approach is also contained in this invention.

[0030] The application as a cell [ as opposed to disease patients, such as a retina denaturation disease, for example, degenerative pigmentosa retinae, age-related macular degeneration, amotio retinae, glaucoma and vasa-sanguinea-retinae obstruction in the retina nerve cell obtained by the differentiation-inducing approach of this invention ] for transplantation is expected.

Furthermore, since it is uniform, the cell of an amount is obtained enough and the neural stem

cell obtained by this invention can do cryopreservation, it has the advantage of enabling a planned therapy.

[0031] Furthermore, according to the differentiation-inducing approach of this invention, changing the direction of differentiation is also expected by addition of cytokine, or installation of a foreign gene.

[0032]

[Example] The rat retina of culture viviparous 18 age in day of an example 1 (1) retina or the Homo sapiens retina of 11 weeks old of viviparous was extracted. 20 ng(s)/ml The serum-free-medium [presentation containing a basic fibroblast growth factor (bFGF). Use DMEM/F12+N2 supplement] and it is 5%CO<sub>2</sub> and 20%O<sub>2</sub>. It cultivated at 37 degrees C the bottom. By 0.125% trypsin [the product made from Gibco], a culture is processed for 5 minutes, is continued at 37 degrees C, in the place which the cell fully increased, and it is 5%CO<sub>2</sub> and 20%O<sub>2</sub> at [medium composition:DMEM/F12+N2 supplement +bFGF] on a collagen coat dish. Subculture was carried out for 30 days at 37 degrees C the bottom. In addition, it carried out by receiving the approval of the Ethics Committee of \*\*\*\*\* about research of a Homo sapiens embryo retina.

Moreover, the following and N2 A supplement is an insulin, 5microg [ ml ], transferrin 100microg [ ml ], pro JIESU TRON 20mM, putrescine 100microM, sodium selenate It is 30nM.

[0033] On the occasion of differentiation inducing, it is 5%CO<sub>2</sub> and 20%O<sub>2</sub> at the culture medium [presentation:DMEM/F12+N2 supplement +0.5microM RA] which removed bFGF from the culture medium of a culture and added fetal calf serum (FBS) and a retinoic acid. It cultivated for two weeks at 37 degrees C the bottom.

[0034] Consequently, neural considered that a neural stem cell is included by that it is surprised by the same approach as a hippocampus origin neural stem cell from the rat and the human embryo retina as shown in drawing 1 It turns out that isolation culture of the sphere can be carried out.

[0035] Subsequently, neural The frozen section was produced for sphere after fixing to a slide glass by paraform ARUDE hide 4%.

[0036] About the obtained intercept, immaturity dyeing was performed by the antibody [the product made from Pharmingen] to NESUCHIN used as the marker of a neural stem cell.

[0037] Consequently, it is shown that almost all cells are NESUCHIN positives. Furthermore, by the retinoic acid, after differentiation inducing, beta-III tubulin and a GFAP positivity cell are seen and an immature nerve and specializing in a neuroglia are shown.

[0038] (2) The eyeball of the 3-4 weeks old DA rat of nerve differentiation inducing from a ciliary body coloring matter epithelial cell was extracted, front sclera was cut open a little to cyclic, and the anterior eye segment was separated from the equatorial section. After removing a retina completely, the lens and the ciliary body non-coloring matter epithelial cell were removed. After isolating a ciliary body organization, each organization is processed at 37 degrees C by Dispace (1000U/ml) for 15 minutes, and subsequently it is 0.05%. By EDTA, it processed at the room temperature for 20 minutes.

[0039] As a coloring matter epithelial cell side becomes an inferior surface of tongue, it makes it paste about some ciliary body organizations on the dish which carried out the laminin coat, said bFGF content serum free medium is used, and it is 5%CO<sub>2</sub> and 20%O<sub>2</sub>. Indirect arrival culture was performed at 37 degrees C the bottom on the 20th.

[0040] For differentiation inducing to a nerve, succeedingly, the culture medium was exchanged for the fetal-calf-serum content culture medium [a presentation:DMEM/F12+N2 supplement + retinoic acid], and culture was continued similarly.

[0041] From a ciliary body coloring matter epithelial cell to consequently, neural Mr. sphere's cell was obtained. Before differentiation inducing to a nerve, the cell of a NESUCHIN positivity was checked, and as for after differentiation inducing, beta-III tubulin and a GFAP positivity cell existed with the fraction too.

[0042] (3) The transgenics by production of a recombination adenovirus vector, production of below transgenics and a recombination adenovirus vector, and this vector is the approach of Kanegae, and Saito and others. [reference name: A transgenics & manifestation analysis laboratory procedure, the 27-42nd page, (1997), and Yodosha issue] It carried out by following.

[0043] The GFP gene which is the Crx gene and reporter gene which are a specific homeobox gene of a visual cell was amplified, respectively, and each gene started with the restriction enzyme was included in the manifestation cosmid cassette. In addition, about the Crx gene, Chx10 gene, and the GFP gene, the plasmid which held the plasmid holding Crx, the plasmid holding Chx10, and GFP, respectively was alike, respectively, and host *Escherichia coli* was amplified more using the transformant obtained by carrying out a transformation.

[0044] Subsequently, the adenovirus which discovers each gene was produced by the homonous rearranging method. Subsequently, a virus was refined by the obtained rearrange, infect adenovirus with 293 cells, proliferate it, and using cesium chloride step gradient method.

[0045] Subsequently, the refined Crx gene expression adenovirus, Chx10 gene-expression adenovirus, or GFP gene expression adenovirus was infected to each of the neural stem cell (or nerve precursor cell) of the ciliary body coloring matter epithelial cell origin.

[0046] The obtained infected cell was succeedingly cultivated under the nerve differentiation condition [the conditions of DMEM/F12+N2 supplement +1% FBS+20ng/ml bFGF].

[0047] The effectiveness given to nerve differentiation in immunocytochemistry-analysis was judged as follows about each of a Crx gene expression adenovirus infected cell, a Chx10 gene-expression adenovirus infected cell, and a GFP gene expression adenovirus infected cell.

[0048] About the cultured cell, the culture medium was fixed to the slide glass after suction removal using the paraformaldehyde 4%, and it blocked using skim milk.

[0049] Each dilution obtained by diluting various primary antibodies [an anti-NESUCHIN antibody, anti-neurofilament 200 antibody, anti-MAP5 antibody, an anti-beta-III tubulin antibody, an anti-GFAP antibody, and an anti-opsin antibody] known as various kinds of nerve markers for an optimum dilution scale factor and the fixed cell were made to react. Subsequently, it was made to visualize using the second antibody [the product made from Amersham] by which fluorescent labeling was carried out.

[0050] About the visualized marker, while observing with the fluorescence microscope, the part carried out photography record using the KONFOKARU microscope. A result is shown in drawing 2.

[0051] When the cell of an opsin positivity which is the marker of a visual cell when differentiation inducing is carried out after introducing Crx or Chx10 using an adenovirus vector and Crx is introduced, as shown in drawing 2 is seen and Chx10 is introduced, it turns out that the PKC activity which is the marker of a bipolar cell is seen. On the other hand, when a gene was not introduced, or when [after introducing a GFP (green fluorescein protein) gene by the adenovirus vector,] differentiation inducing was carried out, an opsin positivity cell was not accepted.

[0052] It is suggested from the above result that an undifferentiated neural stem cell (or nerve precursor cell) is obtained from a rat fetus retina and a *Homo sapiens* embryo retina, and a rat ciliary body epithelium. Moreover, it is suggested by differentiation inducing that a part of neural stem cell (or nerve precursor cell) specializes in a nerve and a gloea. Furthermore, it is shown by obtaining the cell of an opsin positivity which is the marker of a visual cell, for example, introducing Chx10 gene by introducing a homeobox gene, for example, a Crx gene, that the cell of a PKC positivity which is the marker of a bipolar cell is obtained.

[0053] [Effect of the invention] According to the differentiation-inducing approach of this invention, specifically, discovering a neural stem cell to a retina and making take and the cell which was made specializing and was guided from this neural stem cell discovering a function, and the outstanding effectiveness of the ability to make the marker or bipolar cell of a visual cell discovering are done so. Moreover, the application as a cell [as opposed to disease patients, such as a retina denaturation disease, for example, degeneratio pigmentosa retinae, age-related macular degeneration, amotio retinae, glaucoma, and vasa-sanguinea-retinae obstruction, in the retina nerve cell of this invention] for transplantation is expected.

[Translation done.]

\* NOTICES \*

JP0 and NCIP1 are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

1. This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.

2.\*\*\* shows the word which can not be translated.

3.In the drawings, any words are not translated.

DESCRIPTION OF DRAWINGS

[Brief Description of the Drawings]

[Drawing 1] Drawing 1 is neural obtained from the fetus rat retina. It is drawing showing sphere.

[Drawing 2] Drawing 2 is drawing showing the cell which carried out after [installation]

differentiation inducing of the Crx gene using the adenovirus vector. The cell which discovered the opsin which is the marker of a visual cell is accepted.

[Translation done.]

(5i) IntCl <sup>1</sup>		識別記号	F I		フロッピー(参考)
C 12 N	15/09		A 61 K	35/44	4 B 02 4
A 61 K	35/44		35/48		4 B 06 5
	35/48		48/00		4 C 08 4
	48/00		A 61 P	27/02	4 C 08 7
A 61 P	27/02		27/06		

審査請求

未請求

請求項の数 7

OL (全 7 頁)

最終頁に続く

(2i) 出願番号	特開2001-133721(P2001-133721)	(7i) 出願人	5056721 株式会社プロテック 東京都千代田区岸本町2-5-12 高橋 政代 京都市左京区岡崎北御所町25 ウノ橋北御所町501号 菅田 雅俊 京都市左京区東福寺町10 ライオンズア ソシエティ通院105号 (7ii) 代理人 10095832 井理士 細田 秀徳
(22) 出願日	平成13年4月27日 (2001.4.27)	(72) 発明者	菅田 雅俊 京都市左京区東福寺町10 ライオンズア ソシエティ通院105号 (7ii) 代理人 10095832 井理士 細田 秀徳
(54) 発明の名称		細胞の分化誘導方法	
(57) 要約		最終頁に続く	

【要約】 網膜に神経幹細胞を生殖、分化させ、かつ該神経幹細胞から誘導された細胞に機能を発現させること、具体的には、視細胞のラッカー又は双極細胞ラッカーを発現させることが可能な、網膜神経細胞の分化誘導方法；並びに網膜などへの移植に好適な、視細胞のラッカー又は双極細胞ラッカーを呈する網膜神経細胞を提供すること。

【解決手段】 眼球組織由来細胞又は胚性幹細胞から、神経幹細胞又は神経前駆細胞を得、該神経幹細胞又は神経前駆細胞に、網膜特異的オメガ6ボックス遺伝子を導入し、得られた細胞を分化誘導条件下に培養することを特徴とする、網膜神経細胞の分化誘導方法；並びに前記網膜神経細胞の分化誘導方法により得られる網膜神経細胞。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 眼球組織由来細胞又は胚性幹細胞から、神経幹細胞又は神経前駆細胞を得、該神経幹細胞又は神経前駆細胞に、網膜特異的オメガ6ボックス遺伝子を導入し、得られた細胞を分化誘導条件下に培養することを特徴とする、網膜神経細胞の分化誘導方法。

【請求項2】 眼球組織由来細胞が、胎児神経網膜、毛様体色素上皮細胞及び網膜色素上皮細胞からなる群より選ばれた1種である、請求項1記載の分化誘導方法。

【請求項3】 網膜特異的オメガ6ボックス遺伝子が、Crx、Chx10、Pax6およびRaxからなる群より選ばれた少なくとも1種である、請求項1又は2記載の分化誘導方法。

【請求項4】 分化誘導条件が、レチニン酸と血清との存在下における培養である、請求項1～3いずれか1項に記載の分化誘導方法。

【請求項5】 分化誘導条件が、レチニン酸と血清との存在下、N2 サブインゴを含むDMEM/F12で培養する条件である、請求項4記載の分化誘導方法。

【請求項6】 請求項1～5いずれか1項に記載の網膜神経細胞の分化誘導方法により得られる網膜神経細胞、請求項7】 オプティンまたはPKC陽性を呈する、請求項6記載の網膜神経細胞。

【発明の詳細な説明】

【発明の属する技術分野】 本発明は、網膜への移植、特に、自家移植に適した細胞を提供しうる、網膜神経細胞の分化誘導方法及び該分化誘導方法により得られる網膜神経細胞に関する。

【0002】 【従来の技術】 近年、脳・脊髄における神経幹細胞の存在が認められるようになり、この幹細胞を利用したパーキンソン病や網膜色素変性に対する移植治療、神経の再生医療などに期待が寄せられている。

【0003】 神経幹細胞に関して、ラットやマウスの神経幹細胞を用いた移植実験では、脳内に移植された神経幹細胞が適切な位置に移動してニューロンやグリアに分化することが報告されている。

【0004】 眼科領域における再生医療においては、成体ラット海馬由来神経幹細胞を、神経の分化が進行中である生後2～7日のラットの硝子体腔内に注入した場合、該神経幹細胞が網膜へ遊走し、生着して、各種網膜細胞線維に分化し、神経線維も再生することが知られている。

【0005】 しかしながら、網膜神経細胞として機能するまでは、分化せず、光を感受するという網膜神経細胞の機能の発現には至っていないのが現状である。

【0006】 したがって、網膜に神経幹細胞を生殖、分化させ、かつ該神経幹細胞から誘導された細胞に網膜神経

細胞としての機能を発現させることが可能な手段が要求されている。

【0007】

【発明が解決しようとする課題】 本発明は、網膜に神経幹細胞を生殖、分化させ、かつ該神経幹細胞から誘導された細胞に機能を発現させること、具体的には、視細胞のラッカー又は双極細胞ラッカーを発現させることが可能な、網膜神経細胞の分化誘導方法を提供することを目的とする。また、本発明は、網膜などへの移植に好適な、視細胞のラッカー又は双極細胞ラッカーを呈する網膜神経細胞を提供することを目的とする。

【0008】

【課題を解決するための手段】 すなわち、本発明は、

(1) 眼球組織由来細胞又は胚性幹細胞から、神経幹細胞又は神経前駆細胞を得、該神経幹細胞又は神経前駆細胞に、網膜特異的オメガ6ボックス遺伝子を導入し、得られた細胞を分化誘導条件下に培養することを特徴とする、網膜神経細胞の分化誘導方法、(2) 眼球組織由来細胞が、胎児神経網膜、毛様体色素上皮細胞及び網膜色素上皮細胞からなる群より選ばれた1種である、前記(1)記載の分化誘導方法、(3) 網膜特異的オメガ6ボックス遺伝子が、Crx、Chx10、Pax6およびRaxからなる群より選ばれた少なくとも1種である、前記(1)又は(2)記載の分化誘導方法、(4) 分化誘導条件が、レチニン酸と血清との存在下における培養である、前記(1)～(3)いずれか1項に記載の分化誘導方法、(5) 分化誘導条件が、レチニン酸と血清との存在下、N2 サブインゴを含むDMEM/F12で培養することである、前記(4)記載の分化誘導方法、(6) 前記(1)～(5)いずれか1項に記載の網膜神経細胞の分化誘導方法により得られる網膜神経細胞、並びに(7) オプティンまたはPKC陽性を呈する、前記(6)記載の網膜神経細胞、に関する。

【0009】

【発明の実施の形態】 本発明の網膜神経細胞の分化誘導方法は、眼球組織由来細胞から、神経幹細胞又は神経前駆細胞を得、該神経幹細胞又は神経前駆細胞に、網膜特異的オメガ6ボックス遺伝子を導入し、得られた細胞を分化誘導条件下に培養すること、1つの大きな特徴がある。

【0010】 本発明の網膜神経細胞の分化誘導方法によれば、海馬由来神経幹細胞を網膜に移植し分化させた場合では、発現させることが困難であった視細胞又は双極細胞の機能が発現させることができたという優れた効果を奏する。

【0011】 さらに、本発明の網膜神経細胞の分化誘導方法によれば、視細胞又は双極細胞の機能が発現する、具体的には、オプティン又はPKC陽性を呈する細胞を得ることができするため、網膜の再生医療に有用な細胞

3

を開発することができるといふ優れた効果を発揮する。

【0012】本発明の分化誘導方法において、神経幹細胞又は神経前駆細胞を得るのに用いられる組織は、得られた細胞に細胞特異的ホモオボウクス遺伝子を導入することにより、接細胞のヤーカー、例えば、オプシン、又は双極細胞のヤーカー、P K Cを発現しうる組織であればよく、具体的には、眼組織、より具体的には、眼胚内層などが挙げられる。また、かかる組織は、成体由来であっても、胎生期の固体外来であってもよい。

【0013】また、本発明の分化誘導方法においては、胚性幹細胞を用い、胚性幹細胞から、神経幹細胞又は神経前駆細胞を得てもよい。

【0014】前記胚性幹細胞から、神経幹細胞又は神経前駆細胞に誘導する方法としては、例えば、川崎、菅井らの文獻 [Kawasaki, H., Sasai Y., Neuron, 2000 Oct; 28(1):31-40] などに記載の方法などが挙げられる。なお、胚性幹細胞の培養、維持などの条件は、例えば、「分子生物ゾロトコール」、南立堂発行などを参照できる。

【0015】前記組織由来細胞としては、胎児神経細胞、毛細胞色素上皮細胞、網膜色素上皮細胞などが挙げられる。

【0016】前記組織由来細胞は、例えば、適切な手段で抽出した組織を、Dispase、EDTAなどで処理し、ついで、トリプシン処理して単一の細胞まで分離し、さらに、適切な培地でコンフルエントになるまで培養し、得られた細胞をトリプシン処理及びコラゲンで処理することにより採取せしめる。ここで、細胞の採取に際して、培養を行なう場合、後述の増殖性線維芽細胞増殖因子を含有した培地、表皮細胞形成因子を含有した培地、LIF (白血球遊走阻止因子) を含有した培地などの培地を用いることができる。

【0017】神経幹細胞又は神経前駆細胞は、ネズミン等のヤーカーを発現する。

【0018】かかる毛細胞色素上皮細胞由来の神経幹細胞又は神経前駆細胞は本発明の範囲に含まれる。

【0019】なお、前記神経幹細胞又は神経前駆細胞は、これをcellular sphere として得られる場合があるが、本発明においては、かかるneural sphere を以下の遺伝子導入、神経への分化誘導に供してもよい。

【0020】前記増殖性線維芽細胞増殖因子 (bFGF) を含有した無血清培地 (以下、bFGF含有無血清培地) としては、N<sub>2</sub> サブミントを含有したDMEM/F12などが挙げられる。かかる培地における前記増殖性線維芽細胞増殖因子の含有量は、10ng/ml以上、好ましくは、20ng/ml以上、より好ましくは、40ng/ml以上であることが望ましい。

【0021】N<sub>2</sub> サブミントとしては、インスリン 5µg/ml、トランスフェリン100µg/ml、ブドウ糖20mM、ブドウ糖 20mM、ブドウ糖 100µ

4

M、セリン酸ナトリウム 30mMが挙げられる。

【0022】bFGF含有無血清培地中における培養における温度、酸素濃度、二酸化炭素濃度などの条件は、細胞に応じて適宜設定することができる。

【0023】細胞特異的ホモオボウクス遺伝子として、発生過程において、脳の領域特異的な発現様式を有し、かつ領域特異的な形態形成を制御する遺伝子、分化形質の発現に関与する遺伝子が挙げられる。具体的には、Crx、Chx10、Pax6、Raxなどが挙げられる。本発明の分化誘導方法においては、神経幹細胞又は神経前駆細胞への導入により接細胞ヤーカーを発現させることができる観点から、好ましくは、Crx又はChx10が挙げられ、双極細胞ヤーカーを発現させることができる観点から、好ましくは、Chx10が挙げられる。なお、前記Crxの塩基配列は、GenBankアセッシー番号U77615に示される。

【0024】神経幹細胞又は神経前駆細胞への前記細胞特異的ホモオボウクス遺伝子の導入方法としては、例えば、アデノウイルスベクターを用いる遺伝子導入方法、エレトロポレーション、レトロウイルスベクターを用いる遺伝子導入方法、アデノアシタウイルスを用いる遺伝子導入方法、リポフェクション、エレトロポレーションなどが挙げられる。導入効率の観点から、好ましくは、アデノウイルスベクターを用いる遺伝子導入方法及びレトロウイルスベクターを用いる遺伝子導入方法が望ましい。

【0025】ついで、遺伝子導入された神経幹細胞又は神経前駆細胞を網膜神経細胞への分化に適した分化誘導条件下に培養する。

【0026】前記分化誘導条件としては、レチノイン酸と血清との存在下における培養などが挙げられる。ここで、培養に用いられる培地としては、N<sub>2</sub> サブミントを含有したDMEM/F12培地などが挙げられる。また、培養時の温度、酸素濃度、二酸化炭素濃度などの条件は、細胞に応じて適宜設定することができる。

【0027】前記レチノイン酸の使用量は、0.1µM以上であり、好ましくは、0.5µM以上であることが望ましく、10µM以下であり、好ましくは、5µM以下であることが望ましい。

【0028】また、前記血清の使用量は、分化誘導時には、1%程度であることが望ましい。

【0029】分化誘導条件下における遺伝子導入された神経幹細胞又は神経前駆細胞の培養により分化した細胞は、導入した遺伝子が、Crx遺伝子である場合、接細胞のヤーカーであるオプシン型性を呈し、かつ神経細胞のヤーカーであるβ-III チューグリン型性、GFAP陽性などを呈するという特徴を有し、導入した遺伝子が、Chx10遺伝子である場合、双極細胞のヤーカーであるP K C陽性を呈し、かつ神経細胞のヤーカーであるβ-III チューグリン型性、GFAP陽性などを呈す

5

るという特徴を有する。したがって、かかる細胞を網膜神経細胞として、用いることができる。本発明には、かかる分化誘導方法により得られた網膜神経細胞も含まれる。

【0030】本発明の分化誘導方法により得られた網膜神経細胞は、網膜変性疾患、例えば、網膜色素変性、加齢黄斑変性、網膜剥離、緑内障、網膜血管閉塞症などの疾患患者に対する移植細胞としての応用が期待される。さらに、本発明により得られる神経幹細胞は、均一的な分量の細胞が得られ、凍結保存ができるので、計画的な治療を可能にするという利点がある。

【0031】さらに、本発明の分化誘導方法によれば、サイトカインの添加や外来遺伝子の導入によって、分化の方向を変えることも期待される。

【0032】

【実施例】

(1) 網膜の培養

胎生18日胎のラット網膜又は胎生11週胎のヒト網膜を抽出し、20ng/ml 増殖性線維芽細胞増殖因子 (bFGF) を含有した無血清培地 (組成: DMEM/F12+N<sub>2</sub> サブミント) を用いて、5% CO<sub>2</sub>、20% O<sub>2</sub> の下、37℃で培養した。十分に細胞が増殖したところで、培養物を0.125%トリプシン (Gibco社製) により、37℃で5分処理し、ついで、コラーゲンコートデイスジュレ (培地組成: DMEM/F12+N<sub>2</sub> サブミント+bFGF) で5% CO<sub>2</sub>、20% O<sub>2</sub> の下、37℃で30日間、絶対培養した。なお、ヒト胎児網膜の研究に関しては京都大学産の倫理委員会の承認を受け行なった。また、以下、N<sub>2</sub> サブミントは、インスリン 5µg/ml、トランスフェリン 100µg/ml、ブドウ糖 20mM、ブドウ糖 100µM、セリン酸ナトリウム 30mMである。

【0033】分化誘導に際しては、培養物の培地からbFGFを除去し、牛胎肝血清 (FBS) とレチノイン酸を添加した培地 (組成: DMEM/F12+N<sub>2</sub> サブミント+0.5µM RA) で5% CO<sub>2</sub>、20% O<sub>2</sub> の下、37℃で2週間培養した。

【0034】その結果、驚くことに、図1に示さうに、ラット及びヒトの胎児網膜から、海馬由来神経幹細胞と同様の方法で、神経幹細胞を含むと考えられているneural sphere を分離培養することができるとわかった。

【0035】ついで、neural sphere を4%ブドウ糖/DMEM/F12で、スライドラガラスに固定後、凍結切片を製作した。

【0036】得られた切片について、神経幹細胞のヤーカーとされているネズミンに対する抗体 (Pharmingen社製) で免疫染色を行なった。

【0037】その結果、ほぼすべての細胞がネズミン陽性であることが示される。さらに、レチノイン酸で分化誘導後は、β-III チューグリン、GFAP陽性細胞が見られ、幼若な神経や、グリア細胞に分化することが示される。

6

【0038】(2) 毛細胞色素上皮細胞からの増分化誘導

3~4週胎Dラットの眼球を抽出し、赤道部よりやや前方の強膜を機械的に切開して前駆細胞を分離した。網膜を完全に除去したのち、リンス及び毛細胞色素上皮細胞を取り除いた。毛細胞組織を単離したのち、それぞれの組織を、Dispase (1000U/ml) により37℃で15分処理し、ついで、0.05% EDTAにより、室温で20分処理した。

【0039】一部の毛細胞組織については、ラミネックコートしたデイスジュレ上で色素上皮細胞が下面になるようにして培養させ、前記bFGF含有無血清培地を用いて、5% CO<sub>2</sub>、20% O<sub>2</sub> の下、37℃で20日間接殖培養を行なった。

【0040】神経への分化誘導のためには、引き抜いて、培地を、牛胎肝血清含有培地 (組成: DMEM/F12+N<sub>2</sub> サブミント+レチノイン酸) に交換して、同時に培養を継続した。

【0041】その結果、毛細胞色素上皮細胞からneural sphere様の細胞が得られた。神経への分化誘導前は、neural sphere様の細胞が観察され、分化誘導後はやはりβ-III チューグリン、GFAP陽性細胞が少数ながら存在していた。

【0042】(3) 組織をアデノウイルスベクターの作製と遺伝子導入

以下、組織をアデノウイルスベクターの作製及び感染タターによる遺伝子導入は、鶴ヶ江及び青藤らの方法 [文獻名: 遺伝子導入と発現制御法、第27~42頁、(1997)、共立社発行] に従って行なった。

【0043】接細胞の集塊的ホモオボウクス遺伝子であるCrx遺伝子およびレボター遺伝子であるGFPG遺伝子をそれぞれ増殖し、細胞融解で切り出したそれぞれの遺伝子を発現コスミドカセットに組み込んだ。なお、Crx遺伝子、Chx10遺伝子及びGFPG遺伝子について、それぞれ、Crxを保持したプラスミド、Chx10を保持したプラスミド及びGFPGを保持したプラスミドのそれぞれにより宿主大腸菌を形質転換して得られた形質転換体を用いて増殖した。

【0044】ついで、相同的組織換え法により、それぞれの遺伝子を発現するアデノウイルスを製作した。ついで、得られた組織換えアデノウイルスを、2.93細胞に感染させて増殖させ、塩化セリウムを用いたステップグラジェン法によって、ウイルスを精製した。

【0045】ついで、毛細胞色素上皮細胞由来の神経幹細胞 (又は神経前駆細胞) のそれぞれに対し、精製されたCrx遺伝子発現アデノウイルス、Chx10遺伝子



7

発現アデノウイルス又はGFP遺伝子発現アデノウイルスを感染させた。

【0046】得られた感染細胞を、神経分化条件 (DMEM/F12+N<sub>2</sub> サブリミット+1% FBS+20 ng/ml bFGFの条件) 下に、引き続き培養した。

【0047】Crx遺伝子発現アデノウイルス感染細胞、Chx10遺伝子発現アデノウイルス感染細胞及びGFP遺伝子発現アデノウイルス感染細胞のそれぞれについて、以下のように、免疫細胞化学的解析により神経分化に与える効果を判定した。

【0048】培養細胞について、増地を吸引除去後、4%パラホルムアルデヒドを用いて、スライダガラスに固定し、スギムミルチを用いてプロセッサを行った。

【0049】各種の神経マーカーとして知られる様々な一次抗体 (抗ネスチン抗体、抗ニューロフィラメント200抗体、抗MAP5抗体、抗β-IIIチューブリン抗体、抗GFAP抗体、抗オプシン抗体) を至適な希釈倍率に希釈することにより得られた各希釈物と、固定化された細胞とを反応させた。ついで、蛍光標識された二次抗体 (Amersham社製) を用いて、可視化させた。

【0050】可視化されたマーカーについて、蛍光顕微鏡で観察するとともに、その一部はコンフォーカル顕微鏡を用いて撮影記録した。結果を図2に示す。

【0051】図2に示すように、アデノウイルスベクターを用いてCrx又はChx10を導入後、分化誘導した場合、Crxを導入した場合、視細胞のマーカーであるオプシン陽性の細胞が見られ、Chx10を導入した場合、双極細胞のマーカーであるPCK活性が見られることがわかる。一方、遺伝子を導入しなかった場合、あ

8

いはアデノウイルスベクターでGFP (green fluorescent protein) 遺伝子を導入した後、分化誘導した場合においては、オプシン陽性細胞が認められなかった。

【0052】以上の結果より、ラット胎仔網膜及びヒト胎児網膜、ラット毛様体上皮から未分化な神経幹細胞 (又は神経前駆細胞) が得られることが示唆される。また、分化誘導により、神経幹細胞 (又は神経前駆細胞) の一部が、神経とグリアに分化することが示唆される。さらに、ホメオボックス遺伝子、例えば、Crx遺伝子を導入することにより、視細胞のマーカーであるオプシン陽性の細胞が得られ、例えば、Chx10遺伝子を導入することにより、双極細胞のマーカーであるPCK陽性の細胞が得られることが示される。

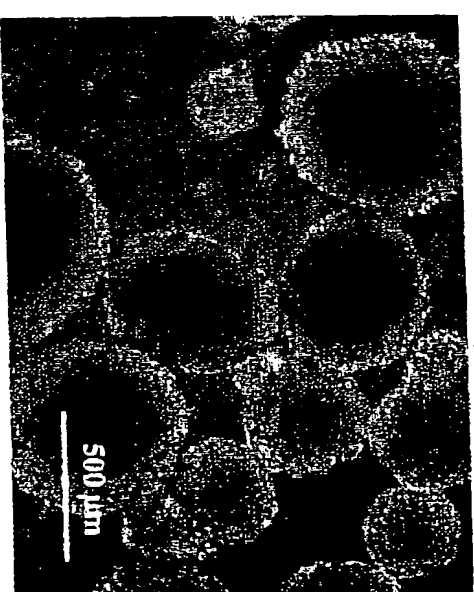
【0053】

【発明の効果】本発明の分化誘導方法によれば、網膜に神経幹細胞を生殖、分化させ、かつ該神経幹細胞から誘導された細胞に機能を発現させること、具体的には、視細胞のマーカー又は双極細胞を発現させることができるという優れた効果を奏する。また、本発明の網膜神経細胞は、網膜変性疾患、例えば、網膜色素変性、加齢黄斑変性、網膜剥離、緑内障、網膜血管閉塞症などの疾患患者に対する移植用細胞としての応用が期待される。

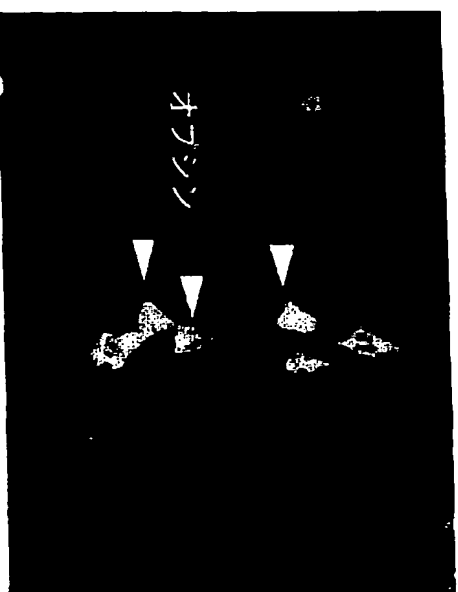
【図面の簡単な説明】

【図1】図1は、胎仔ラット網膜から得られたneural sphereを示す図である。

【図2】図2は、アデノウイルスベクターを用いてCrx遺伝子を導入後分化誘導した細胞を示す図である。視細胞のマーカーであるオプシンを発現した細胞を認める。



【図1】



【図2】

フロントページの続き

(51)Int. Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	フーチャ(参考)
A 6 1 P 27/06		C 1 2 N 15/00	A
C 1 2 N 5/10		5/00	B

Fターム(参考) 4B024 AA01 BA80 CA01 CA04 DA02  
EA02 EA04 FA02 FA10 GA11  
HA17  
4B065 AA90X AA93Y AB01 BA01  
BB25 BB32 BB34 CA44  
4C084 MA13 MA14 ZA332  
4C087 AA01 AA02 AA03 BB56 BB57  
CA04 MA14 ZA33

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☒ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**